PA ENT COOPERATION TREAT

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark Office, PCT
2011 South Clark Place Room CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 12 January 2001 (12.01.01)	
International application No. PCT/JP00/03687	**Applicant's or agent's file reference** 12133
International filing date (day/month/year) 07 June 2000 (07.06.00)	**Priority date** (day/month/year) 07 June 1999 (07.06.99)
Applicant TAKAHASHI, Atsushi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

   [X] in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

   25 October 2000 (25.10.00)

   [ ] in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

   ____

2. The election [X] was [ ] was not

   made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO **34, chemin des Colombettes** **1211 Geneva 20, Switzerland** Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38

EP・US 特許協力条約

PCT

国際調査報告

(法８条、法施行規則第40、41条)
〔ＰＣＴ１８条、ＰＣＴ規則43、44〕

出願人又は代理人の書類記号 12133	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(ＰＣＴ／ＩＳＡ／２２０)及び下記５を参照すること。	
国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ００／０３６８７	国際出願日 (日.月.年) ０７．０６．００	優先日 (日.月.年) ０７．０６．９９
出願人（氏名又は名称） 北興化学工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条（ＰＣＴ１８条）の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で　3　ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1．国際調査報告の基礎
a．言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
b．この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2．☐ 請求の範囲の一部の調査ができない（第Ｉ欄参照）。

3．☐ 発明の単一性が欠如している（第Ⅱ欄参照）。

4．発明の名称は
☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5．要約は
☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第Ⅲ欄に示されているように、法施行規則第47条（ＰＣＴ規則38.2(b)）の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から１カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6．要約書とともに公表される図は、
第＿＿＿＿図とする。☐ 出願人が示したとおりである。　☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

国際調査報告

国際出願番号　PCT／JP00／03687

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int.Cl⁷ C12P19/02、C12N1/20 //(C12P19/02, C12R1:64)、(C12P19/02, C12R1:38)、(C12P19/02, C12R1:02)、(C12P19/02、C12R1:18)、(C12P19/02, C12R1:425) (C12P19/02, C12R1:21)、(C12P19/02, C12R1:01)、(C12N1/20、C12R1:64)、(C12N1/20、C12R1:38)、(C12N1/20、C12R1:18)

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int.Cl⁷ C12P19/02、C12N1/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
REGISTRY/CA(STN)、
WPI/BIOSIS(DIALOG)

C.　関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US, 5406005, A (PICCARIELLO T.) 11.4月.1995 (11.04.95) (ファミリーなし)	1-21
A	DE, 3405663, A (MERCK PATENT GMBH) 22.8月.1985 (22.08.85) & JP, 60-248637, A	1-21
A	EP, 477001, A (ASAHI KASEI KOGYO KK、TOYO JOZO KK) 25.3月.1992 (25.03.92) & JP, 04-126075, A & US, 5356790, A	1-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日　04.09.00	国際調査報告の発送日　12.09.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員）　4N　9641 甲斐　順子　印 電話番号　03－3581－1101　内線　3488

C（続き）．関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	Paul P Hipps et al., "Identification and Partial Characterization of Inositol:NAD^{+} Epimerase and Inosose:NAD(P)H Reductase from the Fat Body of the American Cockroach, *Periplaneta americana* L.", BIOCHEMISTRY, (1973), Vol. 12, No. 23, p. 4705-4712	1-21

8T

REC'D 28 SEP 2001
WIPO PCT

特　許　協　力　条　約

PCT

国際予備審査報告

(法第１２条、法施行規則第56条)
〔ＰＣＴ３６条及びＰＣＴ規則70〕

出願人又は代理人の書類記号　１２１３３	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式ＰＣＴ／ＩＰＥＡ／４１６）を参照すること。	
国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ００／０３６８７	国際出願日 (日.月.年)　０７．０６．００	優先日 (日.月.年)　０７．０６．９９
国際特許分類（ＩＰＣ） Int.Cl⁷ C12P19/02、C12N1/20		
出願人（氏名又は名称） 北興化学工業株式会社		

1．国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（ＰＣＴ３６条）の規定に従い送付する。

2．この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で　３　ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
（ＰＣＴ規則70.16及びＰＣＴ実施細則第６０７号参照）
この附属書類は、全部で＿＿＿＿ページである。

3．この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ ＰＣＴ３５条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日　２５．１０．００	国際予備審査報告を作成した日　１４．０９．０１
名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＰＥＡ／ＪＰ） 郵便番号１００−８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　９６４１ 木村　順子　印 電話番号　０３−３５８１−１１０１　内線　３４８８

様式ＰＣＴ／ＩＰＥＡ／４０９（表紙）（１９９８年７月）

国際予備審査報告　　国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ００／０３６８７

Ｉ．　国際予備審査報告の基礎

１．　この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。（法第６条（ＰＣＴ１４条）の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。ＰＣＴ規則70.16,70.17）

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書　第 ＿＿＿＿ ページ、　出願時に提出されたもの
明細書　第 ＿＿＿＿ ページ、　国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書　第 ＿＿＿＿ ページ、　＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲　第 ＿＿＿＿ 項、　出願時に提出されたもの
請求の範囲　第 ＿＿＿＿ 項、　ＰＣＴ１９条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲　第 ＿＿＿＿ 項、　国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲　第 ＿＿＿＿ 項、　＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面　第 ＿＿＿＿ ページ／図、　出願時に提出されたもの
図面　第 ＿＿＿＿ ページ／図、　国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面　第 ＿＿＿＿ ページ／図、　＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分　第 ＿＿＿＿ ページ、　出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分　第 ＿＿＿＿ ページ、　国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分　第 ＿＿＿＿ ページ、　＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

２．　上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である ＿＿＿＿ 語である。

☐ 国際調査のために提出されたＰＣＴ規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ ＰＣＴ規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたＰＣＴ規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

３．　この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

４．　補正により、下記の書類が削除された。
☐ 明細書　第 ＿＿＿＿ ページ
☐ 請求の範囲　第 ＿＿＿＿ 項
☐ 図面　図面の第 ＿＿＿＿ ページ／図

５．☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。（ＰＣＴ規則70.2(c)　この補正を含む差し替え用紙は上記１．における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。）

Ｖ．　新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第１２条（ＰＣＴ３５条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

１．　見解

新規性（Ｎ）	請求の範囲	１－２１	有
	請求の範囲		無
進歩性（ＩＳ）	請求の範囲	１－２１	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性（ＩＡ）	請求の範囲	１－２１	有
	請求の範囲		無

２．　文献及び説明（ＰＣＴ規則70.7）

文献１：US 5406005 A(PICCARIELLO T.) 11.4月.1995 (11.04.95)

文献２：DE 3405663 A(MERCK PATENT GMBH) 22.8月.1985 (22.08.85)

文献３：EP 477001 A　(ASAHI KASEI KOGYO KK、TOYO JOZO KK) 25.3月.1992 (25.03.92)

文献４：BIOCHEMISTRY,1973,Vol.12,No.23,p.4705-4712.

請求の範囲１－２１に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献１－４に対して進歩性を有する。

文献１－４には、ミオ－イノシトールに微生物を作用させて、Ｌ－エピ－２－イノソースに変換させることからなる、Ｌ－エピ－２－イノソースの製造方法、並びに、上記方法によって製造されたＬ－エピ－２－イノソースに、還元剤を作用させて、エピ－イノシトールとミオ－イノシトールを生成させることからなる、エピ－イノシトールの製造方法は記載されておらず、しかもそのことが、文献１－４から、当業者にとって容易に想到し得たこととも認められない。

1/5T

Translation

09/980453

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 12133	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/03687	International filing date (*day/month/year*) 07 June 2000 (07.06.00)	Priority date (*day/month/year*) 07 June 1999 (07.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P 19/02, C12N 1/20		RECEIVED MAR 2 9 2002 TECH CENTER 1600/2900
Applicant HOKKO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

   ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

   These annexes consist of a total of ______ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

   I ☒ Basis of the report

   II ☐ Priority

   III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

   IV ☐ Lack of unity of invention

   V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

   VI ☐ Certain documents cited

   VII ☐ Certain defects in the international application

   VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
25 October 2000 (25.10.00)	14 September 2001 (14.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

International application No.
PCT/JP00/03687

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- [x] the international application as originally filed
- [ ] the description:
  pages ______, as originally filed
  pages ______, filed with the demand
  pages ______, filed with the letter of ______
- [ ] the claims:
  pages ______, as originally filed
  pages ______, as amended (together with any statement under Article 19
  pages ______, filed with the demand
  pages ______, filed with the letter of ______
- [ ] the drawings:
  pages ______, as originally filed
  pages ______, filed with the demand
  pages ______, filed with the letter of ______
- [ ] the sequence listing part of the description:
  pages ______, as originally filed
  pages ______, filed with the demand
  pages ______, filed with the letter of ______

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language ______ which is:

- [ ] the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- [ ] the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- [ ] the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/ or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- [ ] contained in the international application in written form.
- [ ] filed together with the international application in computer readable form.
- [ ] furnished subsequently to this Authority in written form.
- [ ] furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- [ ] The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- [ ] The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. [ ] The amendments have resulted in the cancellation of:
   - [ ] the description, pages ______
   - [ ] the claims, Nos. ______
   - [ ] the drawings, sheets/fig ______

5. [ ] This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* *Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).*

** *Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.*

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-21	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: US, 5406005, A (Piccariello T.), 11 April, 1995 (11.04.95)
Document 2: DE, 3405663, A (Merck Patent GmbH), 22 August, 1985 (22.08.85)
Document 3: EP, 477001, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd. and Toyo Jozo K.K.), 25 March, 1992 (25.03.92)
Document 4: Biochemistry, 1973, Vol. 12, No. 23, pages 4705-4712

The subject matters of claims 1-21 appear to involve an inventive step in view of documents 1-4 cited in the ISR.

Documents 1-4 do not describe a method of producing L-epi-2-inosose, comprising the step of letting a microbe act on myo-inositol for conversion into L-epi-2-inosose, or a method of producing epi-inositol, comprising the step of letting a reducing agent act on the L-epi-2-inosose produced by the aforesaid method, to produce epi-inositol and myo-inositol, and a person skilled in the art could not have easily conceived of these methods from documents 1-4 either.

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2000年12月14日 (14.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/75355 A1

(51) 国際特許分類7: C12P 19/02, C12N 1/20 // (C12P 19/02, C12R 1:64) (C12P 19/02, C12R 1:38) (C12P 19/02, C12R 1:02) (C12P 19/02, C12R 1:18) (C12P 19/02, C12R 1:425) (C12P 19/02, C12R 1:21) (C12P 19/02, C12R 1:01) (C12N 1/20, C12R 1:64) (C12N 1/20, C12R 1:38) (C12N 1/20, C12R 1:18)

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/03687

(22) 国際出願日: 2000年6月7日 (07.06.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/159861 1999年6月7日 (07.06.1999) JP
特願平11/340523 1999年11月30日 (30.11.1999) JP
特願2000/151709 2000年5月23日 (23.05.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 北興化学工業株式会社 (HOKKO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8341 東京都中央区日本橋本石町四丁目4番20番 Tokyo (JP). 財団法人 微生物化学研究会 (ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYU KAI) [JP/JP]; 〒141-0021 東京都品川区上大崎3丁目14番23号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高橋 篤 (TAKAHASHI, Atsushi) [JP/JP]; 〒214-0021 神奈川県川崎市多摩区宿河原2丁目42番25-201号 Kanagawa (JP). 神辺健司 (KANBE, Kenji) [JP/JP]; 〒227-0047 神奈川県横浜市青葉区みたけ台7番地16 Kanagawa (JP). 森 哲也 (MORI, Tetsuya) [JP/JP]. 北 雄一 (KITA, Yuichi) [JP/JP]; 〒243-0023 神奈川県厚木市戸田2385番地 北興化学厚木寮 Kanagawa (JP). 玉村 健 (TAMAMURA, Tsuyoshi) [JP/JP]; 〒242-0007 神奈川県大和市中央林間5丁目18番4号 Kanagawa (JP). 竹内富雄 (TAKEUCHI, Tomio) [JP/JP]; 〒141-0022 東京都品川区東五反田5丁目1番11号 ニューフジマンション701 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 弁理士 八木田茂, 外(YAGITA, Shigeru et al.); 〒105-0003 東京都港区西新橋1丁目1番15号 物産ビル別館 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, CN, IL, IN, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PROCESS FOR PRODUCING L-EPI-2-INOSOSE AND NOVEL PROCESS FOR PRODUCING EPI-INOSITOL

(54) 発明の名称: L－エピ－2－イノソースの新規製造法とエピ－イノシトールの新規製造法

(57) Abstract: Novel methods whereby L-epi-2-inosose and epi-inositol, which are useful as various drugs or synthesis intermediates, can be efficiently produced from less expensive myo-inositol. Namely, a method wherein myo-inositol is treated with a gram-negative bacterium capable of converting myo-inositol into L-epi-2-inosose to thereby convert the myo-inositol into L-epi-2-inosose. The L-epi-2-inose thus obtained is further reacted in an aqueous reaction medium with a reducing agent comprising an alkali metal boron hydride or another alkali metal hydride to form epi-inositol and myo-inositol. Next, the epi-inositol is separated and isolated from the reduction reaction mixture comprising epi-inositol and myo-inositol to give epi-inositol.

[続葉有]

WO 00/75355 A1

(57) 要約:

各種の医薬あるいは合成中間体として有用なＬ－エピ－２－イノソースとエピ－イノシトールとを、安価なミオ－イノシトールから効率よく製造できる新方法が提供された。すなわち、ミオ－イノシトールをＬ－エピ－２－イノソースへ変換できる変換能を有するグラム陰性細菌を、ミオ－イノシトールに作用させて、ミオ－イノシトールのＬ－エピ－２－イノソースへの変換によりＬ－エピ－２－イノソースを生成する新規方法が開発された。さらに、こうして得たＬ－エピ－２－イノソースを、水性反応媒質中で水素化ホウ素アルカリ金属またはその他のアルカリ金属水素化物よりなる還元剤と反応させて、エピ－イノシトールとミオ－イノシトールを生成させ、しかも得られたエピ－イノシトールとミオ－イノシトールよりなる還元反応生成物からエピ－イノシトールを分離および単離することから成るエピ－イノシトールの新規な製造方法が提供される。

明細書

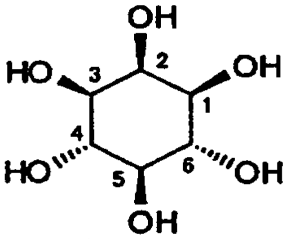
Ｌ－エピ－２－イノソースの新規製造法とエピ－イノシトールの新規製造法

技術分野

本発明は、安価なミオ－イノシトール（myo-Inositol）を原料として用い、それ自体が生物活性を有して且つ医薬品、等の合成の原料としても価値の高いＬ－エピ－２－イノソース（L-epi-２-Inosose）を、化学合成工程を経ず、微生物の作用下に一段階で製造する方法に関する。また本発明はＬ－エピ－２－イノソースを還元して、それ自体が生物活性を有し医薬品として有用なエピ－イノシトール（epi-Inositol）を効率良く製造する方法に関する。

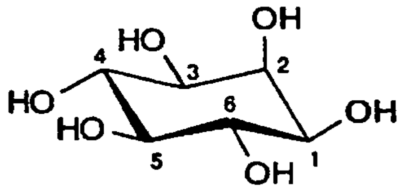
背景技術

ミオ－イノシトールは次の平面式（Ａ）



(A)

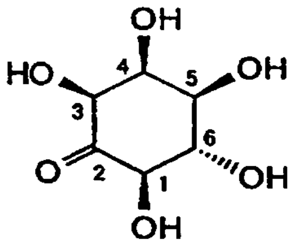
または次の立体構造式（Ａ´）



(A')

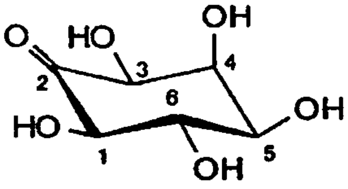
で表される天然に産する既知の物質である。

また、L－エピ－２－イノソースは次の平面式（Ｂ）



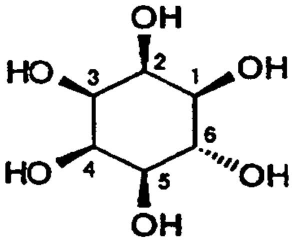
(B)

または次の立体構造式（Ｂ´）



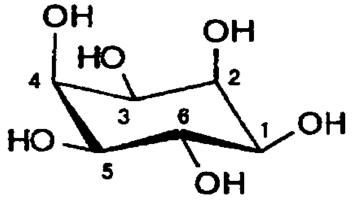
(B')

で表される既知の物質である。さらに、エピーイノシトールは次の平面式（Ｃ）



(C)

または次の立体構造式（Ｃ´）



（C'）

で表される既知の化学合成物質である。エピーイノシトールはミオーイノシトールの立体異生体の一つである。

イノソース（Inososes，別名ではPentahydroxycyclohexanonesまたは Alicyclic ketohexoses）は一般的にイノシトールの微生物的酸化〔A. J. Kluyver & A. Boezaardt：「Rec. Trav. Chim.」５８巻、９５６頁（１９３９）〕、酵素的酸化〔L. Anderson等：「Arch. Biochem. Biophys.」７８巻、５１８頁（１９５８）〕、白金触媒を用いた空気酸化〔K. Heyns and H. Paulsen：「Chem. Ber.」８６巻、８３３頁（１９５３）〕、硝酸等の酸化剤による酸化〔T. Posternak：「Helv. Chim. Acta」１９巻、１３３３頁（１９３６）〕によって合成されることが知られている。

イノシトールのうち、ミオーイノシトールの微生物的酸化あるいは酵素的酸化で生成するイノソースとしては、これまでシローイノソース(別名ミオーイノソースー２)が知られているのみである〔A. J. Kluyver & A. Boezaardt：「Rec. Trav. Chim.」５８巻、９５６頁

（１９３９）、L. Anderson等：「Arch. Biochem. Biophys.」７８巻、５１８頁（１９５８）〕。ミオ－イノシトールを酸化してＬ－エピ－２－イノソースを生成できる微生物はこれまで報告されていない。

Ｌ－エピ－２－イノソースは、D－キロ－イノシトール（ＤＣＩと略記される）の合成原料として有用である（米国特許第５，４０６，００５号）。このＤＣＩはインシュリン抵抗性糖尿病の治療薬として有用であり（ＷＯ９０／１０４３９号公報）、あるいは多嚢胞性卵巣症候群の改善薬として利用される〔J. E. Nestler等：「NEW Engl. J. Med.」３４０巻、１３１４頁（１９９９）〕ことが期待されている。このＬ－エピ－２－イノソースの製法としては、①ミオ－イノシトールの硝酸による酸化で生成するラセミ体のＤＬ－エピ－２－イノソース（(±)－エピ－２－イノソース）を、酸化白金触媒の存在下に水素で還元してエピ－イノシトールを生成し、その後に細菌のアセトバクター・サブオキシダンス（Acetobacter suboxydans）によるエピ－イノシトールの微生物的酸化を行うことにより、Ｌ－エピ－２－イノソースを合成する方法の報告がある〔T. Posternak：「Helv. Chim. Acta」２９巻、１９９１頁（１９４６）〕。また、②Ｄ－グルクロン酸を出発原料にして化学合成したグルコジアルドースをアシロイン縮合して生成する化合物の一つとしてＬ－エピ－２－イノソースが合成され

るという報告がある(米国特許第５，４０６，００５号)。

イノシトールは、シクロヘキサンから誘導される６価アルコールの総称であり、イノシトールには９種の立体異生体が存在する。天然産イノシトールにはミオーイノシトール、Ｄーキローイノシトール、Ｌーキローイノシトール、ムコーイノシトール、シローイノシトールの５種のイノシトールが見出されている。その他のイノシトールにはエピーイノシトール、アローイノシトール、ネオーイノシトール、シスーイノシトールがあり、これら４種のイノシトールは非天然型の化学合成されたイノシトールである。非天然型のイノシトールのうち、エピーイノシトールはうつ病、不安症の改善薬としての利用が期待されている〔R. H. Belmaker等のＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＩＬ／００５２３号の国際公開明細書ＷＯ９９／２２７２７号及びR. H. Belmaker等：「Int. J. Neuropsychopharmacol.」１巻、３１頁（１９９８）参照〕。

このエピーイノシトールの製法としては、（１）ミオーイノシトールの硝酸による酸化で生成するラセミ体のＤ，Ｌーエピー２ーイノソースを酸化白金触媒の存在下で水素で還元してエピーイノシトールを合成する方法〔T. Posternak：「Helv. Chim. Acta」２９巻、１９９１頁（１９４６）〕と、（２）シクロヘキサジエンの２価アルコールをオスミウム酸で酸化してエピーイノシトールを合成する方法〔T. Tschamber等：「Helv. Chim. Acta」

75巻、1052頁（1992）〕と、（3）テトラヒドロベンゾキノンに水素添加してエピ－イノシトールを合成する方法（L. Odier：ＥＰ特願公開５２４０８２号公報）と、（4）ムコ－イノシトールを適当に保護し、酸化、還元の組合せによりエピ－イノシトールを合成する方法〔K. E. Espelie等：「Carbohydrate Res.」46巻、53頁（1976）〕がある。また、グルコースあるいはガラクトースのＦｅｒｒｉｅｒ環化反応及び適当な還元剤での還元反応の組合せによりエピ－イノシトールを合成する方法〔高橋等：「有機合成化学協会誌」58巻、120頁（2000）〕もある。

しかしながら、これら既知のＬ－エピ－２－イノソースの製造方法、およびエピ－イノシトールの製造方法は、いずれも工業的規模で製造する方法としては、操作の煩雑さ、環境汚染あるいは経済性の面で問題があるので、従来法は全て必ずしも満足し得るものではない。従って、工業規模で簡便に且つ効率良くＬ－エピ－２－イノソースを製造する新しい方法、及び簡便に効率良くエピ－イノシトールを製造する新しい方法が要望されている。本発明の目的は、このような要望に合致して種々の利点を有するＬ－エピ－２－イノソース及びエピ－イノシトールを効率よく製造できる新しい方法を提供することにある。

発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討を重ねてきた。その結果、安価に入手できるミオーイノシトールに対して、本発明者等により土壌から新たに分離した細菌の新しい菌株であるキサントモナス・エスピーＡＢ１０１１９株を水性の媒質中で作用させると、式（Ａ）または（Ａ´）で表されるミオーイノシトールの４位の水酸基のみをほぼ選択的に酸化（または脱水素）できて、式（Ｂ）または（Ｂ´）のＬ－エピ－２－イノソースが生成することを見出した。この生成されたＬ－エピ－２－イノソースを単離し、核磁気共鳴スペクトル装置、質量分析装置、旋光度計などにより機器分析を実施した結果、この物質は光学純度の高いＬ－エピ－２－イノソースであることが判明した。

更に、ミオーイノシトールをＬ－エピ－２－イノソースに変換できる活性または能力を有する微生物を広く自然界から探索したところ、グラム陰性細菌、例えばシュードモナダセア（Pseudomonadaceae）科のキサントモナス（Xanthomonas）属またはシュードモナス（Pseudomonas）属の細菌；およびアセトバクテラセア（Acetobacteraceae）科のアセトバクター（Acetobacter）属またはグルコノバクター（Gluconobacter）属の細菌；およびリゾビアセア（Rhizobiaceae）科のアグロバクテリウム（Agrobacterium）属の細菌；エンテロバクテリアセア（Enterobacteriacea）科のエルウィニア（Erwinia）属、エン

テロバクター（Enterobacter）属、セラチア（Serratia）属、エルシニア（Yersinia）属の細菌；およびパステウレアセア（Pasteurellaceae）科のパステウレラ（Pasteurella）属またはヘモフィルス（Haemophilus）属の細菌に属するグラム陰性細菌である分類学的に広範な範囲のグラム陰性細菌のうちに、上記のミオーイノシトールを酸化してＬ－エピ－２－イノソースへ変換できる活性または能力を有する菌株が存在することが明らかになった。これらの中でもミオーイノシトールを酸化してＬ－エピ－２－イノソースへ変換できる高い活性または能力を有する菌株の例として、具体的には、上記に記載のキサントモナス・エスピー　ＡＢ１０１１９株があり、これ以外に、土壌から新たに本発明者らが分離した細菌の新しい菌株であるシュードモナス・エスピー　ＡＢ１０２１５株、あるいはエルウィニア・エスピー　ＡＢ１０１３５株があげられる。

上記した知見に基づいて、Ｌ－エピ－２－イノソースの新しい製造方法が後記の通り工夫された。すなわち、ミオーイノシトール並びに通常の炭素源及び窒素源を含有する液体培地、あるいは通常の炭素源を特に含有しないでミオーイノシトール（これの一部が炭素源となる）と窒素源（窒素源が有機質の窒素源である場合、これの一部も培養条件によっては炭素源になる）とを含有する液体培地中で上記のキサントモナス・エスピー　ＡＢ１

０１１９株あるいはシュードモナス・エスピー ＡＢ１０２１５株あるいはエルウィニア・エスピー ＡＢ１０１３５株、等を好気的に培養すると、これにより、得られた培養液中で、ミオーイノシトールからＬーエピー２ーイノソースを生成させ且つこれを蓄積するようにしてＬーエピー２ーイノソースを効率よく製造できることが知見された。また、Ｌーエピー２ーイノソースの上記の新しい製造方法では、培養液中に蓄積したＬーエピー２ーイノソースは、培養液から使用微生物の菌体の除去後に、得られた培養上清液を陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂等のイオン交換樹脂処理あるいは活性炭処理あるいは結晶化操作にかけることにより、あるいはこれら処理の組合せにかけるとこにより、高純度なＬーエピー２ーイノソースとして効率良く回収できることが知見された。

さらに、本発明者等が別途の研究を行った結果、上記のように培養液中で生成および蓄積されたＬーエピー２ーイノソースを含む培養液から、菌体を除去し、そしてその後、得られた培養上清液に、直接に、適当な量の水素化ホウ素ナトリウムまたはこれと均等な水素化物の他の還元剤を添加して、培養上清液中でＬーエピー２ーイノソースに該還元剤を反応させる場合に、Ｌーエピー２ーイノソースがエピーイノシトールに効率よく還元されることが知見された。すなわち、培養上清液からＬーエ

ピー２－イノソースは単離されなくとも、培養上清液内で上記還元剤との反応によりＬ－エピー２－イノソースはエピーイノシトールに効率良く還元され得ることが見出された。

さらに、上記のキサントモナス・エスピー　ＡＢ１０１１９株に代表されるところの、ミオーイノシトールを酸化によりＬ－エピー２－イノソースに変換できる能力を有するグラム陰性細菌でミオーイノシトールを処理する方法、並びに得られた培養上清液から生成されたＬ－エピー２－イノソースを単離せずに、培養上清液中でＬ－エピー２－イノソースを適当な還元剤で処理してエピーイノシトールを生成し収得する方法について種々の実験を本発明者等は行った。その結果、多くの知見が得られた。それらの知見に基づいて本発明を完成するに至った。

従って、第１の本発明においては、ミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物を、ミオーイノシトールに作用させて、それにより前記ミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換させてＬ－エピー２－イノソースを生成することをから成ることを特徴とする、Ｌ－エピー２－イノソースの製造方法が提供される。

第１の本発明によるＬ－エピー２－イノソースの製造方法は、具体的には、以下に示す（Ａ）及び（Ｂ）の２

つの実施方法で行うことができる。

実施方法（Ａ）は、上記のミオ－イノシトールをＬ－エピ－２－イノソースに変換できる能力を有する微生物を、ミオ－イノシトール並びに炭素源及び窒素源を含有する液体培地で好気的に培養し、その培養液中にＬ－エピ－２－イノソースを生成蓄積させて培養液を取得する工程と、得られた培養液から菌体を除去し、そして生成蓄積させたＬ－エピ－２－イノソースを、得られた培養上清液から、イオン交換樹脂処理、活性炭処理または結晶化操作あるいはそれらの処理などの組合せにより、回収する工程とを含む方法である。

実施方法（Ｂ）は、上記能力を有する微生物を培養し、得られた培養物から該微生物の菌体を分離する工程と、該菌体を、溶解されたミオ－イノシトールを含む緩衝液または液体培地に加え、該緩衝液または液体培地中でミオ－イノシトールと反応させ、得られた反応液中にＬ－エピ－２－イノソースを生成させる工程と、反応液に生成蓄積させたＬ－エピ－２－イノソースを、反応液からイオン交換樹脂処理、活性炭処理または結晶化操作あるいはこれら処理の組合せにより、回収する工程とを含む方法である。

第１の本発明の方法において使用する微生物は、ミオ－イノシトールをＬ－エピ－２－イノソースに変換する活性または能力を有する微生物であれば、いずれの菌株

でも良い。

具体的に例示すると、前述したようにミオーイノシトールからＬ－エピ－２－イノソースを生産できる菌には多種の細菌が存在する。例えば本発明者らが分離した前記のＡＢ１０１１９株、ＡＢ１０２１５株、ＡＢ１０１３５株は本発明方法に最も有効に使用される細菌の例である。前記の３種の菌株の菌学的性質を後記の表１ａ、表１ｂ、表１ｃ、表１ｄに示した。

尚、前記の３種の菌株の同定を行うに当たっては、新細菌培地学講座（第２版、近代出版）、医学細菌同定の手引き（第２版、近代出版）、細菌学実習提要（丸善）に準じて、同定のための実験を行った。また、得られた実験結果をBergey's Manual of Systematic Bacteriology VOL. 1 （１９８４）を参考に評価して、菌株の同定を行った。

［表１ａ］

形態的特徴	AB10119株	AB10215株	AB10135株
(1)細胞形態：	桿菌で大きさは0.4～0.6×0.6～4.0μm。多形性がある。	桿菌で、大きさは0.3～0.5×0.6～6.5μm。多形性がある。	桿菌で、大きさは0.4～0.6×0.8～2.0μm。多形性は無い。
(2)運動性：	−	−	−
(3)普通寒天培地上での生育状態	生育は中程度。ｺﾛﾆｰ形態は円形、平滑で光沢がある。色調は黄土色～黄色。	生育は旺盛。ｺﾛﾆｰ形態は円形、平滑で光沢がある。色調は黄土色。	生育は微量。ｺﾛﾆｰ形態は円形、平滑で光沢がある。色調は乳白色。
(4)最少培地（炭素源グルコース）での生育状態	生育は微量。	生育は旺盛。	生育せず。
生理生化学的性状			
(1)ｸﾞﾗﾑ染色：	−	−	−
(2)OFﾃｽﾄ	O (Oxidative)	O (Oxidative)	F (Fermentative)
(3)好気条件での生育：	+	+	+
(4)嫌気条件での生育：	−	−	+(weak)
(5)生育温度：			
8℃	−	−	−
10℃	−	−	+
13℃	+	+	+
17℃	+	+	+
21℃	+	+	+
37℃	+	+	+
40℃	+	+	−
42℃	−	−	−
47℃	−	−	−
(6)食塩耐性：			
0%	+	+	+
2%	+	+	+
5%	−	−	+
10%	−	−	−

［表１ｂ］

	AB10119株	AB10215株	AB10135株
生理生化学的性状			
(7)生育pH：			
pH3	−	−	−
pH4	−	−	+
pH5	+	+	+
pH6	+	+	+
pH7	+	+	+
pH8	+	+	+
pH9	+(weak)	+(weak)	+
pH10	−	−	+(weak)
(8)色素の産生：			
ﾏﾝﾆｯﾄ酵母ｴｷｽ寒天培地(不溶性色素の検出用)	菌体が薄い黄土色～黄色に着色	菌体が僅かに黄色に着色	−
King培地(水溶性色素の検出用)	寒天中に薄い黄色の色素を産生	寒天中に薄い黄色の色素を産生	−
(9)ﾁﾄｸﾛｰﾑｵｷｼﾀﾞｰｾﾞの産生	−	−	−
(10)ｶﾀﾗｰｾﾞの産生：	+	+	+
(11)硝酸塩の還元性	−	+	+
(12)硫化水素の産生：	−	−	−
(13)ｱｾﾄｲﾝの産生：	+	−	+
(14)ｾﾞﾗﾁﾝの液化	+	+	+
(15)Tween 80の分解：	+	+	−
(16)ｲﾝﾄﾞｰﾙの産生：	−	−	−
(17)ﾏﾛﾝ酸の利用性：	−	−	−
(18)ONPGの分解性：	+	+	+
(19)ｴｽｸﾘﾝの分解性：	+	+	

［表１ｃ］

	AB10119株	AB10215株	AB10135株
生理生化学的性状			
(20)デオキシリボヌクレアーゼ活性：	+	+	−
(21)クエン酸利用性：	+	+	−
(22)アミノ酸に対するデカルボキシラーゼ活性：			
L−リジン	−		−
L−アルギニン	−	−	−
L−オルニチン	−		−
(23)尿素分解性：	−	−	−
(24)アセトアミド分解性：	−	−	−
(25)リトマスミルク：	凝固せず	凝固せず	凝固せず
(26)澱粉の分解：	−	−	−
(27)色素及び薬剤感受性試験：			
0.01%メチルグリーン	+	+	+
0.01%チオニン	+	+	−
0.01%酢酸鉛	−	−	−
(28)各種糖類からの酸の生成：			
グルコース	+	+	+
キシロース	+	+	+
マンノース	+	+	+
アラビノース	+	+	+
フルクトース	+	+	+
マルトース	+	+	+
ラムノース	−	−	−
マンニトール	−	−	+
シュークロース	−	−	+
アドニオール	−	−	−
ミオーイノシトール	−	−	−

[表1d]

	AB10119株	AB10215株	AB10135株
生理生化学的性状			
(28)各種糖類からの酸の生成：			
ｿﾙﾋﾞﾄｰﾙ	−	−	−
ｶﾞﾗｸﾄｰｽ	+	+	+
ﾄﾚﾊﾛｰｽ	−	−	−
ｾﾛﾋﾞｵｰｽ	+	+	+
ｲﾇﾘﾝ	−	−	−
ｽﾞﾙｼﾄｰﾙ	−	−	−
ｻﾘｼﾝ	+	−	−
ﾗｸﾄｰｽ	−	+	+
ｸﾞﾘｾﾛｰﾙ	−	−	+
ﾗﾌｨﾉｰｽ	−	+	−
α−メチルｰｸﾞﾙｺｰｽ	−	−	−
(29)炭素源の資化性：			
ｸﾞﾙｺｰｽ	+	+	−
ｾﾛﾋﾞｵｰｽ	+	+	−
ﾏﾙﾄｰｽ	+	+	−
ﾗｸﾄｰｽ	+	+	−
ﾄﾚﾊﾛｰｽ	+	+	−
ｶﾞﾗｸﾄｰｽ	+	+	−
D-ﾌﾙｸﾄｰｽ	+	+	−
ﾐｵｰｲﾉｼﾄｰﾙ	−	+	−
ｻﾘｼﾝ	−	+	−
L-ﾋｽﾁｼﾞﾝ	+	+	−
L-グルタミン酸	+	+	−
ｸﾞﾘｼﾝ	−	−	−
ﾊﾟﾝﾄﾃﾝ酸	−	+	−
ｱｽﾊﾟﾗｷﾞﾝ	−	+(weak)	−
ﾒﾁｵﾆﾝ	−	+	−
(30)ユビキノンの分子種	Q8	Q8	Q8
(31)DNAのGC含量（HPLC法）	68	68	50

ＡＢ１０１１９株の主な菌学的性状は、次のとおりである。本菌株はコロニーが黄色の色素を帯びるグラム陰性の桿菌で、大きさは0.4～0.6×0.6 ～ 4.0 μm。また、本菌株はカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性であり、グルコースを好気的に分解し酸を生成する。最少培地での本菌株の生育は悪いが、最小培地にメチオニンを添加すると良好な生育となる。硝酸塩の還元性は無く、0.01 %のメチルグリーン及びチアニンに感受性であった。本菌株の細胞のユビキノン分子の種はＱ８で、ＤＮＡのＧＣ含量は68 %であった。

これらの菌学的性質を総合して、ＡＢ１０１１９株はキサントモナス(Xanthomonas)属に属する菌株であると判断した。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology VOL. 1 （１９８４） １９９頁～２１０頁によると、キサントモナス属細菌には５種のスペシーズ（キサントモナス・カンペストリス；キサントモナス・フラガリアエ；キサントモナス・アルブリネンス；キサントモナス・アキソノポディス；キサントモナス・アメリザ）が知られている。ＡＢ１０１１９株の菌学的性状を上記の既知のスペシーズと比較検討した結果、ＡＢ１０１１９株はキサントモナス・カンペストリスに最も近縁の種とであると考えられた。しかし、本菌株の菌学的性質はキサントモナス・カンペストリスに完全には一致しなかったので、本ＡＢ１０１１９株を公知のものと区別するため、

キサントモナス・エスピー AB10119株と命名し、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に在る工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17382として寄託した（寄託日は1999年5月7日）。さらに、2000年5月23日の寄託日で前記の研究所にAB10119株はブダペスト条約の規約下にＦＥＲＭ ＢＰ－７１６８の受託番号で寄託された。

また、AB10215株の主な菌学的性状は、次のとおりである。本菌体はコロニーが淡黄色の色素を帯びるグラム陰性の桿菌で、大きさは0.3 ～0.5×0.6 ～ 6.5μm。また本菌株はカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性であり、グルコースを好気的に分解し酸を生成する。最少培地での本菌株の生育は良好であり、硝酸塩の還元性を有する。0.01 %のメチルグリーン及びチアニンに感受性であった。本菌株の細胞のユビキノン分子の種はＱ８で、DNAのＧＣ含量は68%であった。

これらの菌学的性質を総合すると、AB10215株はBergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1（１９８４）140頁～199頁に記載されているシュードモナス・マルトフィリアに最も近縁な種であると考えられる。しかし、AB10215株は、その菌学的性質においてシュードモナス・マルトフィリアに完全には合致しなかったので、本菌株を公知のものと区別するため、シュードモナス・エスピー AB10215と命名し、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に在る工業技術院生命工学工業技術研究所に

FERM P-17804として寄託した（寄託日2000年3月31日）。さらに、2000年5月23日の寄託日で前記の研究所にAB10215株はブダペスト条約の規約下にFERM BP-7170の受託番号で寄託された。

一方、AB10135株の主な菌学的性状は、次のとおりである。本菌株はコロニーが乳白色の色素を帯びるグラム陰性の桿菌で、大きさは0.4～0.6×0.8～2.0μm。本菌株はグルコースを好気的・嫌気的のいずれの条件でも分解し酸を生成するが、好気的条件での生育に比べて嫌気的条件での生育は非常に悪い。また、本菌株はカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性である。普通寒天培地での本菌株の生育は微量であるが、普通寒天培地に5％シュークロースを添加すると非常に旺盛な生育を示す。本菌株の細胞のユビキノン分子の種はQ8で、DNAのGC含量は50％であった。

これらの菌学的性質を総合して、AB10135株はエルウィニア(Erwinia)属に属する菌株であると判断した。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1（1984） 469頁～476頁によると、エルウィニア属細菌は15種に分類されているが、AB10135株はいずれの種とも、その菌学的性質において完全には合致しなかった。従って、ＡＢ１０１３５株を公知のものと区別するため、エルウィニア・エスピー　ＡＢ１０１３５と命名し、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号に在る工業技術院生

命工学工業技術研究所にＦＥＲＭ　Ｐ－１７８０３として寄託した（寄託日は２０００年３月３１日）。さらに、２０００年５月２３日の寄託日で前記の研究所にＡＢ１０１３５株はブダペスト条約の規約下にＦＥＲＭ　ＢＰ－７１６９の受託番号で寄託された。

以下に、第１の本発明の方法の前記した実施方法（Ａ）～（Ｂ）をより詳しく説明する。

実施方法（Ａ）では、ミオーイノシトールならびに炭素源および窒素源を含む栄養液体培地で、ミオーイノシトールをＬ－エピ－２－イノソースに変換できる能力を有する微生物を好気的に培養し、その培養液中に、Ｌ－エピ－２－イノソースを生成蓄積させる第１工程が行われる。

ここに用いる液体培地の組成は、目的を達する限り何ら特別の制限はない。用いる液体培地は、Ｌ－エピ－２－イノソースへの変換原料であるミオーイノシトールを含み、これに加えて、炭素源、窒素源、有機栄養源、無機塩類等を含有する培地であればよい。合成培地または天然培地のいずれも使用できる。用いる液体培地は、ミオーイノシトールを0.1％～40％、より好ましくは20～30％含有し、炭素源としては、グルコース、シュークロース、マルトースあるいは澱粉を0.1％～20％、より好ましくは0.5～５％を含有し、また窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、硫酸アンモニウム、塩化

アンモニウム、硝酸アンモニウムあるいは尿素等を0.01%～5.0%、好ましくは0.5%～2.0%含有するのが望ましい。その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、マンガン、亜鉛、鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成することができる無機塩類を培地中に添加することが有効である。得られる培養液中の水素イオン濃度をpH4～10、好ましくはpH5～9に調整しながら、菌を培養すると、効率よくL－エピ－2－イノソースを生成できる。

菌の培養条件は、用いた菌株や培地の種類によっても異なるが、培養温度は5～40℃、好ましくは20～37℃である。また、培養は液体培地を振とうしたり、液体培地中に空気を吹き込むなどして好気的に行うのが好ましい。培養期間は、培養液中でミオ－イノシトールが完全に消失し、且つ生成されたL－エピ－2－イノソースが最大の蓄積量を示すまでの期間であるのが良く、通常1～14日、好ましくは3～10日である。上記の第1工程によって、L－エピ－2－イノソースを含む培養液が得られる。

次に、培養液から目的のL－エピ－2－イノソースを採取する第2工程が行われる。この採取には、培養液から通常の水溶性中性物質を単離精製する一般的な方法を応用することができる。すなわち、L－エピ－2－イノソースを含む培養液から先づ菌体を除去し、その後、培養上清液を活性炭やイオン交換樹脂等で処理するが、こ

れらの方法により、Ｌ－エピ－２－イノソース以外の不純物を培養上清液からほとんど除くことができる。しかし、イオン交換樹脂処理には、強塩基性陰イオン交換樹脂のＯＨ⁻型はＬ－エピ－２－イノソースを化学変化させるので使用することはできない。その後、こうして活性炭またはイオン交換樹脂で処理された培養上清液から、Ｌ－エピ－２－イノソースは、結晶化および必要に応じて再結晶する方法等を用いることにより、目的生成物として単離することができる。

前記の培養上清液からＬ－エピ－２－イノソースを回収するためには、より具体的には、Ｌ－エピ－２－イノソースを蓄積、含有した培養上清液を、不望成分の除去の目的で強酸性陽イオン交換樹脂、例えばデュオライト（登録商標）Ｃ－２０（Ｈ⁺型）を充填したカラムに通過させて、通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集め、先に得られた通過液と洗浄液を合併し、その合併された溶液を弱塩基性陰イオン交換樹脂、例えばデュオライト（登録商標）Ａ３６８Ｓ（遊離塩基型）を充填したカラムに通過させ、通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を合併して、Ｌ－エピ－２－イノソースを含むがそれ以外の不純物をほとんど含まない水溶液を収得するのが好ましい。この水溶液を濃縮して、得られたＬ－エピ－２－イノソース

の濃厚溶液に、エタノールの適当量を加え、室温または低温で一晩放置すると、純粋なＬ－エピ－２－イノソースの結晶を晶出できる。

第１の本発明方法の前記した実施方法（Ｂ）では、所望の能力を有する微生物を培養し、得られた培養物から該微生物の菌体を分離し、該菌体を、ミオ－イノシトールを含む緩衝液または液体培地に加え、該緩衝液または液体培地中でミオ－イノシトールと反応させ、得られた反応液中にＬ－エピ－２－イノソースを生成させる諸工程が行われる。

上記のミオ－イノシトールと菌体との反応工程で用いる菌体としては、実施方法（Ａ）の第１工程により得た培養液から分離して集めた菌体を用いてもよく、また、前記微生物を別途の工程で適当な培養条件で培養して得た菌体を用いてもよい。集菌は、培養液を遠心分離、濾過等にかけて菌体を分離する公知の方法により行えばよい。

ミオ－イノシトールと菌体を反応させるための反応媒質としては、液体培地または緩衝液が用いられる。液体培地としては、実施方法（Ａ）の第１工程において用いたものと同様の組成のものを用いてもよい。また別途に前記微生物を培養した後に、その培養液から菌体を除去して得られた培養上清液よりなる液体培地を、そのまま用いてもよい。緩衝液としては、リン酸緩衝液、トリス

緩衝液、グッド（Good's）のＣＨＥＳ緩衝液等を10～500ｍＭ、好ましくは20～100ｍＭの濃度で用いればよい。緩衝液または液体培地にとかされたミオ－イノシトールの溶液中のミオ－イノシトールの当初の濃度は0.1～40％（重量）程度とするのが好ましい。

ミオ－イノシトールと菌体との反応条件は、菌株や培地、緩衝液の種類によって異なるが、反応温度は５～60℃、好ましくは10～45℃であり、反応時間は１～50時間、好ましくは３～48時間である。液体培地または緩衝液のpHは２～10、好ましくは３～９である。

ミオ－イノシトールと菌体との反応の終了後に、得られた反応液からの目的物質のＬ－エピ－２－イノソースを単離する方法は実施方法（Ａ）の第２工程と同様に行えばよい。

第２の本発明においては、ミオ－イノシトールをＬ－エピ－２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物を水性媒質中でミオ－イノシトールに作用させて、前記ミオ－イノシトールのＬ－エピ－２－イノソースへの変換によりＬ－エピ－２－イノソースを該水性媒質中に生成させ、これにより微生物菌体とＬ－エピ－２－イノソースとを含有する反応液を収得し、次いで該反応液から菌体を除去してＬ－エピ－２－イノソースを含有する反応液ろ液を収得し、さらに得られたＬ－エピ－２－イノソース含有の反応液ろ液に適当な還元剤を直接に添加し

て該還元剤をL－エピ－2－イノソースに作用させてエピ－イノシトールとミオ－イノシトールを生成させることから成ることを特徴とする、エピ－イノシトールの製造方法が提供される。

第2の本発明の方法は、具体的には、以下に示す（C）、（D）及び（E）の3つの実施方法で行うことができる。

第2の本発明方法の実施方法（C）は、ミオ－イノシトールをL－エピ－2－イノソースへ変換できる能力を有する微生物を、第1の本発明方法の実施方法（A）に記載の微生物培養方法と同様な要領により、ミオ－イノシトール並びに炭素源及び窒素源を含有する液体培地よりなる水性媒質中で好気的に培養しながら、該微生物を培養液中でミオ－イノシトールに作用させて、得られた培養液中にミオ－イノシトールのL－エピ－2－イノソースへの変換により、L－エピ－2－イノソースを生成し且つ蓄積させて培養液を収得する工程（第1工程）と、反応液として得られた培養液から該微生物の菌体を除去して、その後、得られたL－エピ－2－イノソースを単離せずに、L－エピ－2－イノソースを含有する反応液ろ液として得られた培養上清液を収得する工程（第2工程）と、該培養上清液に対して直接に還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加し、該還元剤でL－エピ－2－イノソースを還元する反応を

行い、これによりエピーイノシトール及びミオーイノシトールを該培養上清液内で生成する工程(第３工程)と、こうして得られたところの還元反応の反応液、すなわち生成されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを含有する培養上清液から、エピーイノシトールとミオーイノシトールを回収する工程(第４工程)と、回収されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを相互から分離する工程(第５工程)とからなる方法である。

第２の本発明方法の実施方法（Ｄ）は、ミオーイノシトールをＬーエピー２ーイノソースへ変換できる能力を有する微生物を第１の本発明方法の実施方法（Ｂ）に記載の微生物培養方法と同様な要領により、炭素源及び窒素源を含有する液体培地で好気的に培養して該微生物の培養液を収得し、さらに該培養液から該微生物の菌体を分離する工程(第１工程)と、こうして得られた微生物菌体を水性の緩衝液または液体培地よりなる水性媒質中でミオーイノシトールと反応させて、Ｌーエピー２ーイノソースを生成させる工程(第２工程）と、こうして得られたところの、該微生物菌体と生成されたＬーエピー２ーイノソースとを含有する反応液から菌体を除去して、これにより、微生物菌体を除去されたＬーエピー２ーイノソースを含有する得られた反応液ろ液を収得する工程（第３工程）と、この反応液ろ液に還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アル

カリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加し、該還元剤をL－エピ－２－イノソースに作用させて還元する反応を行い、これによりエピ－イノシトール及びミオ－イノシトールを該反応液ろ液内で生成する工程（第４工程）と、生成されたエピ－イノシトール及びミオ－イノシトールを含有するその還元反応の反応液から、エピ－イノシトールとミオ－イノシトールを回収する工程（第５工程）と、回収されたエピ－イノシトールとミオ－イノシトールを相互から分離する工程（第６工程）とからなる方法である。

第２の本発明方法の実施方法（Ｅ）は、上記の実施方法（Ｃ）及び（Ｄ）における還元剤を添加してL－エピ－２－イノソースを還元剤で還元する工程を行う前に、L－エピ－２－イノソースを含有する培養上清液または反応液濾液よりなる水性媒質のpHを、pH８～12の範囲のアルカリ性に予め調整する工程を行い、その後、L－エピ－２－イノソースを含有するpH８～12の水性媒質に還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加して該還元剤をL－エピ－２－イノソースに作用させて還元する反応を行うことから成る方法である。実施方法（Ｅ）により、副成されたミオ－イノシトールの生成量よりもはるかに高い生成量でエピ－イノシトールを生成させるようにして、エピ－イノシトールが

製造される。

第２の本発明方法で使用される微生物は、第１の本発明方法で用いられたところの、ミオーイノシトールをＬーエピー２ーイノソースへ変換できる能力を有する微生物と同じであることができる。

以下に、第２の本発明の方法の前記した実施方法（Ｃ）〜（Ｅ）をより詳しく説明する。

第２の本発明方法の前記の実施方法（Ｃ）では、要約すると、ミオーイノシトールを含む液体栄養培地に、所望の能力を有する微生物を接種して好気的に培養することにより、培養液中にＬーエピー２ーイノソースを生成蓄積させて培養液を収得する第１工程と、培養液から微生物菌体を除去して、Ｌーエピー２ーイノソースを含有する培養上清液を収得する第２の工程と、その後に培養上清液からＬーエピー２ーイノソースを単離せず、該培養上清液に適当な還元剤を直接に添加し、Ｌーエピー２ーイノソースの還元反応を行う第３工程と、こうして得られた還元反応の反応液から生成されたエピーイノシトールを回収する第４工程とが行われる。

すなわち、第２の本発明方法の実施方法（Ｃ）において、所望の能力を有する微生物をミオーイノシトール含有の液体培地で培養しながら培養液中にＬーエピー２ーイノソースを生成、蓄積させて培養液を収得する第１工程が先ず行われるが、この第１工程は、第１の本発明方

法の実施方法（A）の第1工程と全く同様に行うことができる。

実施方法（C）の第2工程では、第1工程で得られた培養液から菌体を除去してL－エピ－2－イノソースを含有する培養上清液を収得する工程を行う。その後、第3工程では、得られた培養上清液に直接に還元剤として水素化物を添加して還元反応を行う。これによって、培養上清液内でL－エピ－2－イノソースからエピ－イノシトール及びミオ－イノシトールが生成される。使用される還元剤は、水系中でL－エピ－2－イノソースをエピ－イノシトールに還元できる還元剤として、例えば、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化トリメトキシホウ素ナトリウム、シアン化水素化ホウ素ナトリウムであるのが望ましい。還元反応は0℃～室温で行う。L－エピ－2－イノソースの消失した時点または反応生成物の生成量が適当になった時点で還元反応を終了する。これによって、生成されたエピ－イノシトール及びミオ－イノシトールを含有する培養上清液が還元反応の反応液として第3工程で得られる。

ここで得られた還元反応の反応液である培養上清液から、エピ－イノシトール及びミオ－イノシトールを回収する第4の工程を次に行う。この第4の回収工程では、第3工程から得られてエピ－イノシトール及びミオ－イ

ノシトールを含有する培養上清液を、不望成分の除去の目的で強酸性陽イオン交換樹脂、例えばデュオライト(登録商標)C－20（H^+型）を充填したカラムに通過させ、通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を合併し、その合併された溶液を強塩基性陰イオン交換樹脂、例えばデュオライト（登録商標）Ａ１１３（OH^-型）を充填したカラムに通過させ、通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を合併して、エピーイノシトール及びミオーイノシトールを含みそれ以外の不純物をほとんど含まない水溶液を収得するのが好ましい。

実施方法（Ｃ）の最終（第５）工程では、先の第４工程で回収されたエピーイノシトール及びミオーイノシトールの水溶液からエピーイノシトールとミオーイノシトールを別々に分離する。これらの生成物の分離のためには、前記のエピーイノシトールとミオーイノシトールの水溶液を減圧下に濃縮し、その濃縮液を強塩基性陰イオン交換樹脂、例えばアンバーライト(登録商標)ＣＧ－４００(OH^-型)を充填したカラムに通過させ、その後このカラムに脱イオン水を通過させることによって該カラムを溶出し、これによって、ミオーイノシトールを主として含有する溶出液画分と、目的とするエピーイノシトールを含有する溶出液画分とを別々に得ることが好まし

い。このエピーイノシトールを含む水溶液を濃縮して、得られたエピーイノシトールの濃厚溶液に、エタノールの適当量を加え、室温または低温で一晩放置すると、純粋なエピーイノシトールの結晶を晶出できる。

なお、実施方法（Ｃ）において、上記の還元終了後に、生成されたエピーイノシトールを含む培養上清液を、直列された複数のイオン交換樹脂カラムで処理する第４工程を行うと、エピーイノシトール及びミオーイノシトールを含有するが、その他の不純成分をほとんど含有しない水溶液が得られる。このエピーイノシトールとミオーイノシトールの水溶液を濃縮し、得られた濃縮液を、スルホン酸基を交換基とするスチレン重合体よりなる強酸性陽イオン交換樹脂（Ca^{2+}型）、例えばダイヤイオン（登録商標）ＵＢＫ５２０Ｍ（Ca^{2+}型）のカラムに通して、カラムにエピーイノシトール及びミオーイノシトールを吸着させ、ついでカラムを脱イオン水で溶出するようにして第５工程を行う場合には、ミオーイノシトールからエピーイノシトールを効率よく分離できることが本発明者等によって見出されている。

第２の本発明方法の前記の実施方法（Ｄ）では、要約すると、栄養液体培地で所望の能力を有する微生物を接種して好気的に培養し、得られた培養液から微生物菌体を分離し、これにより、該菌体を大量に収得する第１工程と、こうして得られた該菌体を、緩衝液あるいは液体

培地よりなる水性媒質中で、これに溶解させたミオーイノシトールに作用させて、L－エピ－2－イノソースを生成させる第2工程と、ここで得られた反応液から菌体を除去して、菌体が除去されたL－エピ－2－イノソースを含有する反応液ろ液を得る第3工程と、L－エピ－2－イノソースを単離せず、該反応液ろ液に適当な還元剤を添加し、L－エピ－2－イノソースの還元反応を行い、これによりエピーイノシトールとミオーイノシトールを生成する第4工程と、こうして得られた還元反応液から、生成されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを回収する第5工程と、回収されたエピーイノシトールをミオーイノシトールから分離する第6工程とが行われる。

この実施方法（D）の第1工程では、使用される所望の変換能を有する微生物を、微生物の培養に常用される液体培地で好気的に培養し、得られた培養液から該微生物の菌体を分離する。この様に分離された菌体を実施方法（D）の第2工程で使用する。菌体としては、実施方法（A）の第1工程により得た培養液から菌体を分離して集めた菌体を用いても良い。また、前記の使用微生物を別途の工程により適当な培養条件で培養して得た菌体を用いてもよい。菌体の分離と集菌は、培養液を遠心分離、濾過等の公知の手段にかけることにより行えば良い。

実施方法（D）の第2工程において、菌体をミオーイ

ノシトールに反応させるための液体反応媒質としては、緩衝液または液体培地よりなる水性媒質が用いられる。液体培地としては、実施方法（A）の第1工程で用いたものと同様のものを用いても良い。緩衝液としては、リン酸緩衝液、グッド（Good's）のCHES緩衝液等を10～500mM、好ましくは20～100mMの濃度で用いれば良い。ここで用いた水性の反応媒質にとかしたミオーイノシトールの濃度は、0.1～30％（重量）の程度とするのが望ましい。菌体とミオーイノシトールとの反応条件は、使用菌株や使用された反応媒質の緩衝液または液体培地の種類によって異なる。反応温度は5～60℃、好ましくは10～45℃であり、反応時間は1～50時間、好ましくは3～48時間である。水性反応媒質として用いられる緩衝液または液体培地のpHはpH2～10、好ましくは3～9である。該第2工程で微生物菌体をミオーイノシトールと反応させると、L－エピ－2－イノソースを含有する反応液が得られる。

実施方法（D）の第3工程では、第2工程で得られたL－エピ－2－イノソース含有反応液から遠心分離、濾過等の公知の手段により菌体を除去し、これによってL－エピ－2－イノソースを含有する反応液濾液を収得する。次の第4工程では、第3工程で得られたところの、菌体を除かれたL－エピ－2－イノソース含有の反応液濾液に対して、還元剤としての水素化物を添加して、L

ーエピー２ーイノソースの還元反応を行い、これによりエピーイノシトール及びミオーイノシトールを生成する。この第４工程の還元反応は、実施方法（Ｃ）の第３工程で説明したと同じ要領で行いうる。

次いで、エピーイノシトール及びミオーイノシトールを含有する還元反応液からエピーイノシトール及びミオーイノシトールをそれらの水溶液として回収する第５工程を行う。その後に、エピーイノシトール及びミオーイノシトールを含有する水溶液からエピーイノシトールを収得する第６工程を行う。これら第５及び第６工程は、先に実施方法（Ｃ）の第４工程および第５工程で説明した手法と同様に実施できる。

さらに第２の本発明方法の前記した実施方法（Ｅ）においては、第３の本発明方法の実施方法（Ｃ）の第２工程ならびに実施方法（Ｄ）の第４工程を行うに先立ち、すなわちＬーエピー２ーイノソースを含有した前記の培養上清液あるいは反応液濾液にアルカリ金属水素化物型の還元剤を添加して還元反応を行う工程に先立ち、還元剤を添加する前に、予め前記の培養上清液あるいは反応液濾液を、水酸化ナトリウムあるいは水酸化カリウムあるいは炭酸ナトリウムあるいは炭酸カリウムの添加によりpH８ー11、望ましくはpH９ー10に調整して置く工程を行い、そして、その後に還元剤を添加し還元反応を行うのである。このようにアルカリ性に反応媒質のpHを調整

することにより、反応媒質のpHを未調整（通常pH５－７）で還元反応を行う場合（通常エピーイノシトール６～７部に対しミオーイノシトール３～４部が生成する）と比較すると、生成するエピーイノシトールの量が1.3～1.5倍に増加し、副成するミオーイノシトールの量が１／２～１／４に減少することが本発明者の別途の研究で知見された。実施方法（Ｅ）によると、pH８～11の水性媒質中で、Ｌ－エピ－２－イノソースを前記の水素化物で還元することによって、副成されたミオーイノシトールの生成量よりもはるかに高い生成量でエピーイノシトールを生成させることができる。

前記のＡＢ１０１１９株、ＡＢ１０２１５株およびＡＢ１０１３５株は新規な微生物であって、ミオーイノシトールからＬ－エピ－２－イノソースを生産できる有用性を有する。従って、第３の本発明においては、ミオーイノシトールをＬ－エピ－２－イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所にＦＥＲＭ　ＢＰ－７１６８の受託番号で寄託されたキサントモナス・エスピーＡＢ１０１１９株が新規微生物として提供される。

また、第４の本発明においては、ミオーイノシトールをＬ－エピ－２－イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所にＦＥＲＭ　ＢＰ－７１７０の受託番号で寄託されたシュードモナス・エス

ピーＡＢ１０２１５株がが新規微生物として提供される。

さらに、第５の本発明においては、ミオーイノシトールをＬーエピー２ーイノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所にＦＥＲＭ　ＢＰー７１６９の受託番号で寄託されたエルウィニア・エスピーＡＢ１０１３５株が新規微生物として提供される。

第１の本発明および第２の本発明によれば、医農薬合成原料として有用な純度の高いＬーエピー２ーイノソースと、医薬として有用なエピーイノシトールとがそれぞれに工業生産規模で安価に且つ簡便に製造することができる。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明を下記の実施例について具体的に説明する。

実施例１

（ａ）第１の本発明の実施方法（Ａ）によるＬーエピー２ーイノソースの製造例（１）

（１）Ｌーエピー２ーイノソースの生成（第１例）

ミオーイノシトール　12.0%（360ｇ）、　酵母エキス　1.2%、$(NH_4)_2SO_4$　0.1%、K_2HPO_4　0.7%、KH_2PO_4　0.2%、$MgSO_4\cdot 7H_2O$　0.01%を含むpH７の液体培地３リットルを、100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピー

AB10119株（FERM　BP－7168の受託番号で寄託）を接種し、27℃で3日間振とう培養した。培養液を遠心分離（8,000rpm、20分間）し、培養上清液を得た。

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより下記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはL－エピ－2－イノソースが66mg／mlの濃度で生成している（ミオ－イノソースからL－エピ－2－イノソースへの変換率55.6％）ことがわかった。この時の培養上清液中にミオ－イノシトールは検出されなかった。

なお、上記のL－エピ－2－イノソースへの変換率は、次の計算式により求めた。

変換率（％）＝〔培養上清液1ml中のL－エピ－2－イノソースのモル数÷液体培地1ml中のミオ－イノシトールのモル数〕×100

高速液体クロマトグラフィーの分析条件は以下の通りである。

カラム：Wakosil　5NH$_2$：4.6×350mm

カラム温度：40℃

検出器：RI　DETECTER　ERC－7515A（ERMA CR. INC.）

注入量：20μl

溶媒：アセトニトリル－水＝4：1

溶出時間：L－エピ－2－イノソース　；

6.7分

（２）Ｌ－エピ－２－イノソースの生成（第２例）

ミオ－イノシトール　25.0%（250mg／ml）、グルコース　1.0%、酵母エキス　0.7%を含むpH未調整の液体培地400mlを、100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピーＡＢ１０１１９株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７１６８の受託番号で寄託）を接種し、27℃で５日間振とう培養した。培養液を遠心分離（8,000rpm、20分間）し、培養上清液を得た。

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより前記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはＬ－エピ－２－イノソースが247mg/mlの濃度で生成している（変換率99.9%）ことがわかった。この時の培養上清液中にミオ－イノシトールは検出されなかった。

なお、上記のＬ－エピ－２－イノソースへの変換率は、前記の計算式により求めた。

（３）Ｌ－エピ－２－イノソースの生成（第３例）

ミオ－イノシトール　4.0%（40mg／ml）、酵母エキス　0.2%、$(NH_4)_2SO_4$　0.1%、K_2HPO_4　0.7%、KH_2PO_4　0.2%、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$　0.01%を含むpH７の液体培地100mlを500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。この三角フラスコにエルウィニア・エスピーＡＢ１０１

３５株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７１６９の受託番号で寄託）を接種し、27℃で５日間振とう培養した。培養液を遠心分離（8,000rpm、20分間）し、培養上清液を得た。

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより前記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはＬ－エピ－２－イノソースが22mg／mlの濃度で生成している（変換率55.6％）ことがわかった。この時の培養上清液中にミオ－イノシトールは検出されなかった。

なお、上記のＬ－エピ－２－イノソースの変換率は、前記の計算式により求めた。

（４）Ｌ－エピ－２－イノソースの生成（第４例）

ミオ－イノシトール　25.0％（250mg／ml）、グルコース　1.0％、酵母エキス　0.7％を含むpH未調整の液体培地100mlを、500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにシュードモナス・エスピーＡＢ１０２１５株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７１７０の受託番号で寄託）を接種し、27℃で５日間振とう培養した。培養液を遠心分離（8,000rpm、20分間）し、培養上清液を得た。

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより前記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはＬ－エピ－２－イノソースが244mg/mlの濃度で生成している（変換率98.7％）ことがわかった。この時の培養上清液中にミオ－イノシトールは検出されなかった。

(b) L－エピ－2－イノソースの回収と単離

上記の実施例1（2）で得た培養上清液を、強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト（登録商標）C－20（H^+型）80mlを充填したカラム（内径2cm、長さ30cm）に通過させ、その後このカラムに80mlのイオン交換水（脱イオン水）を通過させて洗浄した。この通過液及び洗浄液を、合併して、合併された溶液を弱塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト（登録商標）368S（遊離塩基型）160mlを充填したカラム（内径3cm、長さ30cm）に通過させ、その後このカラムに160mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。

こうして得られた通過液及び水洗浄液を合併して得られた水溶液中には、上記L－エピ－2－イノソースが含有される以外に、不純物はほとんど存在していなかった。

上記の合併により得た水溶液を減圧下で200mlまで濃縮した。その濃縮液にエタノールを3倍量加え5℃で一晩放置したところ、純粋なL－エピ－2－イノソースの無色結晶を60g得た。この時の精製品の回収率は60.7%、ミオ－イノシトールからのL－エピ－2－イノソースの全回収率は60.6%であった。

なお、上記L－エピ－2－イノソースの精製品回収率は次の計算式により求めた。

精製品回収率（%）＝〔精製単離したL－エピ－2－イノソース量÷培養上清液400ml中に含まれた精製前の

L－エピ－２－イノソースの量〕×100

また、上記L－エピ－２－イノソースの全回収率は次の計算式により求めた。

全回収率（％）＝〔精製単離したL－エピ－２－イノソースのモル数÷液体培地400ml中に含有されたミオ－イノシトールのモル数〕×100

実施例２

第１の本発明の実施方法（A）によるL－エピ－２－イノソースの製造例（２）

（１）種培養物の調製

ミオ－イノシトール　2.0％、酵母エキス　0.2％、$(NH_4)_2SO_4$ 0.1％、K_2HPO_4　0.7％、KH_2PO_4 0.2％、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01％を含むpH７の液体培地100mlを500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピーＡＢ１０１１９株（FERM　BP－７１６８）を接種し、27℃で１日間振とう培養した。この培養液を種培養物として用いた。

（２）４L容ジャーファーメンターによるL－エピ－２－イノソースの製造

ミオ－イノシトール　12.0％、酵母エキス　1.2％、$(NH_4)_2SO_4$ 0.1％、K_2HPO_4 0.7％、KH_2PO_4 0.2％、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01％を含むpH７の液体培地2.5リットルを、４L容ジャーファーメン

ターに分注し、オートクレーブ滅菌した。このジャーファーメンターにキサントモナス・エスピーＡＢ１０１１９株の、上記（１）の方法で調製した種培養物25mlを接種した。この後、培養温度は27℃、通気量は１vvm、回転数は200rpmで培養を実施した。培養は３日間行い、培養期間中のpHを５Ｍ　ＮａＯＨ水溶液及び３Ｍ　塩酸で７±0.2に自動調整した。３日間培養後の培養液を遠心分離（8,000rpm、20分間）し、上清を培養上清液として得た。

この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより前記と同様の条件で分析した。この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより下記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはＬ－エピ－２－イノソースが60mg／mlの濃度で生成している（変換率50.6％）ことがわかった。

反応液からのＬ－エピ－２－イノソースの単離方法は、実施例１（ｂ）に記載した方法に準じて行い、結晶として114ｇ（精製品回収率76.0％）を得た。また、この時のミオ－イノシトールからのＬ－エピ－２－イノソースの全回収率は38.4％であった。

なお、上記Ｌ－エピ－２－イノソースの変換率は、上記実施例１に準じた計算式で求め、また精製品回収率は次の計算式により求めた。

精製品回収率（％）＝〔精製単離したＬ－エピ－２－イノソース量÷培養上清液2.5リットル中に含有された

精製前のL－エピ－2－イノソース量〕×100

また、上記L－エピ－2－イノソースのミオ－イノシトールからの全回収率は次の計算式により求めた。

全回収率（％）＝〔精製単離したL－エピ－2－イノソースのモル数÷培地2.5リットル中に含有されたミオ－イノシトールのモル数〕×100

実施例3

第1の本発明の実施方法（B）によるL－エピ－2－イノソースの製造例

（1）菌体の生産

ミオ－イノシトール 0.5％、$(NH_4)_2SO_4$ 0.1％、K_2HPO_4 0.7％、KH_2PO_4 0.2％、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01％を含むpH7の液体培地2Lを500ml容のバッフル付き三角フラスコに100mlずつ分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピ－AB10119株（FERM BP－7168）を接種し、27℃で3日間振とう培養した。この培養液を遠心分離して菌体を得た。得られた菌体を、0.05M リン酸緩衝液（pH7.0）200mlで洗浄後、再度遠心分離し、洗浄菌体を得た。

（2）L－エピ－2－イノソースの製造

上記により得られた洗浄菌体35gを、ミオ－イノシトール4gを含有した0.05M リン酸緩衝液（pH7.0）400ml（ミオ－イノシトール濃度は10mg／ml）中に加えた。

得られた混合物を30℃、24時間緩やかにスターラーで攪拌しながら反応させた。反応終了後、反応液を液体クロマトグラフィーにより分析したところ、L－エピ－２－イノソースが６mg／ml(変換率60.7%)の濃度で生成、蓄積していた。反応液からのL－エピ－２－イノソースの単離方法は、実施例１（ｂ）に記載した方法に準じて行い、結晶として1.6ｇ(精製品回収率66.7%)を得た。また、上記L－エピ－２－イノソースのミオ－イノシトールからの全回収率は40.4%であった。

なお、上記のL－エピ－２－イノソースの変換率は、上記実施例１に準じて求め、精製品回収率は次の計算式により求めた。

精製品回収率（%）＝〔精製単離したL－エピ－２－イノソース量÷反応液400ml中の精製前のL－エピ－２－イノソース量〕×100

また、上記L－エピ－２－イノソースのミオ－イノシトールからの全回収率は次の計算式により求めた。

全回収率（%）＝〔精製単離したL－エピ－２－イノソースのモル数÷緩液 400ml 中に添加したミオ－イノシトールのモル数〕×100

実施例４

第２の本発明の実施方法（C）によるエピ－イノシトールの製造例

（１）L－エピ－２－イノソースの生成

ミオーイノシトール　25.0％（500ｇ）、グルコース1.0％、酵母エキス　2.5％を含むpH未調整の液体培地２リットルを、100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピーＡＢ１０１１９株（ＦＥＲＭ　Ｐ－７１６８）を接種し、27℃で５日間振とう培養した。培養液を遠心分離（8,000rpm、20分間）し、培養上清液を得た。

この培養上清液を実施例１、（１）に示した高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、培養上清液中にはＬ－エピ－２－イノソースが415ｇ（ミオーイノシトールからＬ－エピ－２－イノソースへの変換率は83.9％）生成していることがわかった。

（２）エピーイノシトールの生成

前項（１）で得たＬ－エピ－２－イノソース含有の培養上清液の２リットルに還元剤としての水素化ホウ素ナトリウムの29.2ｇを徐々に加えた。還元反応を室温で行った。反応の終了後、培養上清液（還元反応の反応液）を高速液体クロマトグラフィーにより下記の条件で分析した．その結果、還元反応後の反応液（培養上清液）は、生成したエピーイノシトールの235.8ｇを含有し、副生成物として、ミオーイノシトールの102.4ｇを含有していることがわかった（エピーイノシトールとミオーイノシトールの合計反応収率は80.6％）。Ｌ－エピ－２－イノソース

からのエピーイノシトールの変換率は56.2％であった。

高速液体クロマトグラフィーの分析条件は以下の通りである。

カラム：Wakosil　５ＮＨ$_2$：4.6×250mm

カラム温度：40℃

検出器：RI　DETECTER　ERC－７５１５Ａ

（ERMA CR. INC.）

注入量：20μ l

溶媒：アセトニトリル－水＝４：１

溶出時間：エピイノシトール；　8.5分

なお、エピーイノシトールとミオーイノシトールの合計反応収率（％）は次式で計算した。

〔還元反応後の培養上清液中のエピーイノシトールのモル数とミオーイノシトールのモル数の合計÷還元反応前の培養上清液中のＬ－エピ－２－イノソースのモル数〕×100

また、上記のＬ－エピ－２－イノソースからエピーイノシトールへの変換率は次の計算式により求めた。

変換率（％）＝〔還元反応後の培養上清液中のエピーイノシトールのモル数÷還元反応前の培養上清液中のＬ－エピ－２－イノソースのモル数〕×100

（３）エピーイノシトールの回収と単離の１例

前項（２）で得た還元反応後の反応液（培養上清液）を二等分した。一方の上清液を強酸性陽イオン交換樹脂デ

ュオライト（登録商標）C－２０（H^{+}型）300mlを充填したカラム（内径５cm、長さ30cm）に通過させ、その後このカラムに400mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。この通過液及び洗浄液を合併して、強塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト（登録商標）A－１１３（OH^{-}型）600mlを充填したカラム（内径５cm、長さ60cm）に通過させ、その後このカラムに700mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。

こうして得られた通過液及び水洗浄液を合併した。ここで合併により得られた水溶液は、エピーイノシトールと副生成物としてのミオーイノシトールとを含有するが、これら以外に不純物をほとんど含有しなかった。

上記により得た水溶液を減圧下で300mlまで濃縮した。その濃縮液（300ml）の４分の１量（75ml）を、強塩基性陰イオン交換樹脂アンバーライト（登録商標）CG－４００（OH^{-}型）1500mlを充填したカラム（内径５cm、長さ200cm）に通過させ、その後このカラムに脱イオン水を通過させて溶出した。該カラムの溶出液はミオーイノシトールを主として含む画分と、所望なエピーイノシトールを主として含む画分とに分け集めた。前記の濃縮液の残りの４分の３（225ml）についても同様な操作を行うことにより、エピーイノシトールを専ら含む溶出液を収得できた。これを濃縮乾固して、エピーイノシトールを73g得た。さらにこのエピーイノシトールを水に溶かし15%

の水溶液とした後、エタノールを2倍量加えて5℃で一晩放置して再結晶させた。こうして純粋なエピーイノシトールの結晶63gが得られた（精製品回収率53.4%）。ミオーイノシトールからのエピーイノシトールの全収率は25.2%であった。

なお、上記エピーイノシトールの精製品回収率は次の計算式により求めた。

精製品回収率（%）＝〔結晶として単離したエピーイノシトールの量÷還元反応後の上清液中のエピーイノシトールの量〕×100

また、上記のミオーイノシトールからのエピーイノシトール全回収率は次の計算式により求めた。

全回収率（%）＝〔結晶として単離したエピーイノシトールの量÷培地1リットルに含有されたミオーイノシトールの量〕×100

（4）エピーイノシトールの回収と単離の第2例

前項（3）で二等分された還元反応後の反応液（培養上清液）の残りの一方を、強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト（登録商標）C－20（H^+型）300mlを充填したカラム（内径5cm、長さ30cm）に通過させ、その後このカラムに400mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。この通過液及び洗浄液を、強塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト（登録商標）A－113（OH^-型）600mlを充填したカラム（内径5cm、長さ60cm）に通過させ、その後このカラ

ムに700mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。

上記により通過液及び水洗浄液を合併して、合併により得られた水溶液を減圧下で300mlまで濃縮した。その濃縮液（300ml）を強酸性陽イオン交換樹脂ダイヤイオン(登録商標)ＵＢＫ５２０Ｍ（Ｃａ$^{+}$型）1500mlを充填したカラム(内径５cm、長さ200cm)に通過させ、その後このカラムに脱イオン水を通過させて溶出した。該カラムの溶出液はミオーイノシトールを主として含む画分と、所望なエピーイノシトールを主として含む画分とに分け集めた。このクロマトグラフィー操作でエピーイノシトールを75ｇ得た。さらにこのエピーイノシトールを水に溶かし15%の水溶液とした後、エタノールを２倍量加えて５℃で一晩放置して再結晶させた。こうして純粋なエピーイノシトールの結晶66ｇ(精製品回収率56.０%)を得た。この時の出発原料として用いたミオーイノシトールからのエピーイノシトールの全回収率は26.４%であった。

なお、上記エピーイノシトールの精製品回収率及び全回収率は前項(３)と同様に計算した。

<u>実施例５</u>

<u>第２の本発明の実施方法（Ｃ）および（Ｅ）によるエピーイノシトールの製造例</u>

（１）Ｌーエピー２ーイノソースの生成

ミオーイノシトール　25.０%、グルコース　1.０%、酵母エキス　0.７%を含むpH未調整の液体培地100mlを

500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにキサントモナス・エスピーＡＢ１０１１９株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７１６８）を接種し、27℃で５日間振とう培養した。培養液を遠心分離（8,000rpm、20分間）し、培養上清液を得た。

この培養上清液を実施例１、（１）に示した高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、培養上清液中にはＬ－エピ－２－イノソースが23g（ミオ－イノシトールからＬ－エピ－２－イノソースへの変換率93.0%に相当）の量で生成していることがわかった。

（２）エピ－イノシトールの生成

前項（１）で得たＬ－エピ－２－イノソース含有の培養上清液100mlに、５Ｍの水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH10に調整した。その後、直ちに水素化ホウ素ナトリウム1.3gをpH10の培養上清液に徐々に加えた。還元反応を室温で行った。反応の終了後、培養上清液（反応液）を高速液体クロマトグラフィーにより前記実施例４、（２）記載の条件で分析した．その結果、還元反応後の反応液（培養上清液）は、生成したエピ－イノシトールの18.4gを含有し、副生成物として、ミオ－イノシトールの0.8gを含有していることがわかった（エピ－イノシトールとミオ－イノシトールの合計反応収率は82.6%）。Ｌ－エピ－２－イノソースからのエピ－イノシトールの変換率は79.1%であった。

この時のエピーイノシトールとミオーイノシトールへの合計反応収率は次の計算式により求めた。

エピーイノシトールとミオーイノシトールの合計反応収率（％）＝〔還元反応後の培養上清液中のエピーイノシトールのモル数とミオーイノシトールのモル数の合計÷還元反応前の培養上清液中のＬ－エピー２－イノソースのモル数〕×100

また、上記のＬ－エピー２－イノソースからのエピーイノシトールへの変換率は次の計算式により求めた。

変換率（％）＝〔還元反応後の培養上清液中のエピーイノシトールのモル数÷還元反応前の培養上清液中のＬ－エピー２－イノソースのモル数〕×100

（３）エピーイノシトールの回収と単離

反応液からのエピーイノシトールの回収と精製、単離は、実施例４、（４）に記載した方法に準じて行った。エピーイノシトールの結晶として15.7ｇを得た。このときの反応液中のエピーイノシトールからの精製品回収率は85.3％であった。反応液中のＬ－エピー２－イノソースに基づくエピーイノシトールの収率は67.5％、出発原料として用いたミオーイノシトールからのエピーイノシトールの全回収率は62.8％であった。

なお、上記の反応液中のエピーイノシトールからのエピーイノシトールの精製品回収率は次の計算式により求めた。

精製品回収率（％）＝〔精製単離したエピーイノシトール量÷還元反応後の培養上清液100ml中に含有された精製前のエピーイノシトール量〕×100

また、上記のＬ－エピ－２－イノソースに基づくエピーイノシトールの収率は次の計算式により求めた。

収率（％）＝〔精製単離したエピーイノシトールのモル数÷還元反応前の培養上清液100ml中に含有された還元反応前のＬ－エピ－２－イノソースのモル数〕×100

また、上記のミオーイノシトールからのエピーイノシトールの全回収率は次の計算式により求めた。

全回収率（％）＝〔精製単離したエピーイノシトール量÷培養開始時の培養液100ml中に含有されたミオーイノシトール量〕×100

産業上の利用可能性

本発明によれば、ミオーイノシトールから、医薬の合成用中間体として有用なＬ－エピ－２－イノソースが簡便に且つ効率よく製造できる。また、本発明によれば、ミオーイノシトールからＬ－エピ－２－イノソースが生成され、さらにＬ－エピ－２－イノソースの還元により、各種の医薬として有用なエピーイノシトールが簡便に且つ効率よく製造できる。従って、本発明方法は産業上で有用である。

請求の範囲

１．ミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物を、ミオーイノシトールに作用させて、それにより前記ミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換させてＬ－エピー２－イノソースを生成することから成ることを特徴とする、Ｌ－エピー２－イノソースの製造方法。

２．請求の範囲１に記載のミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物が細菌である、請求の範囲１に記載の方法。

３．請求の範囲１に記載のミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物がグラム陰性細菌である、請求の範囲１に記載の方法。

４．請求の範囲１に記載のミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物が、グラム陰性細菌であり、シュードモナダセア（Pseudomonadaceae）科に属するキサントモナス（Xanthomonas）属またはシュードモナス（Pseudomonas）属の細菌、あるいはアセトバクテラセア（Acetobacteraceae）科に属するアセトバクター（Acetobacter）属またはグルコノバクター（Gluconobacter）属の細菌、あるいはリゾビアセア（Rhizobiaceae）科に属するアグロバクテリウム（Agrobacterium）属の細菌、あるいはエンテロバクテリアセア（Enterobacteriacea）科に属するエルウィニア（Erwin

ia）属、エンテロバクター（Enterobacter）属、セラチア（Serratia）属またはエルシニア（Yersinia）属の細菌、あるいはパステウレアセア（Pasteurellaceae）科に属するパステウレラ（Pasteurella）属またはヘモフィルス（Haemophilus）属の細菌から選ばれるグラム陰性細菌である、請求の範囲1に記載の方法。

５．請求の範囲１に記載のミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物が、キサントモナス（Xanthomonas）・エスピーＡＢ１０１１９株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７１６８として寄託）あるいはシュードモナス（Pseudomonas）・エスピーＡＢ１０２１５株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７１７０として寄託）あるいはエルウィニア（Erwinia）・エスピーＡＢ１０１３５株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７１６９として寄託）である、請求の範囲１に記載の方法。

６．請求の範囲１に記載のミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物を、ミオーイノシトール並びに炭素源及び窒素源を含有する液体培地で好気的に培養し、その培養液中において該微生物をミオーイノシトールに作用させて培養液中にＬ－エピー２－イノソースを生成、蓄積させる、請求の範囲１に記載の方法。

７．請求の範囲１に記載のミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物を

培養し、得られた培養物から該微生物の菌体を分離し、該菌体を、溶解されたミオーイノシトールを含む緩衝液または液体培地に加え、該緩衝液または液体培地中でミオーイノシトールと反応させ、得られた反応液中にＬ－エピ－２－イノソースを生成させる工程を含む、請求の範囲１に記載の方法。

８．請求の範囲６または７に記載の方法により、生成、蓄積されたＬ－エピ－２－イノソースを含有する培養液または反応液を収得し、さらに該培養液または反応液から、菌体を除去し、その後、菌体を除去されたＬ－エピ－２－イノソースを含有する培養上清液または反応液ろ液を、イオン交換樹脂処理または活性炭処理または結晶化操作あるいはこれらの組合せの処理にかけ、この処理により、高純度のＬ－エピ－２－イノソースを培養上清液または反応液ろ液から回収することを特徴とする、請求の範囲１に記載の方法。

９．ミオーイノシトールをＬ－エピ－２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物を水性媒質中でミオーイノシトールに作用させて、前記ミオーイノシトールのＬ－エピ－２－イノソースへの変換によりＬ－エピ－２－イノソースを該水性媒質中に生成させ、これにより微生物菌体とＬ－エピ－２－イノソースとを含有する反応液を収得し、次いで該反応液から菌体を除去してＬ－エピ－２－イノソースを含有する反応液ろ液を収得し、さら

に得られたＬ－エピ－２－イノソース含有の反応液ろ液に適当な還元剤を直接に添加して該還元剤をＬ－エピ－２－イノソースに作用させてエピ－イノシトールとミオ－イノシトールを生成させることから成ることを特徴とする、エピ－イノシトールの製造方法。

１０．請求の範囲９に記載のミオ－イノシトールをＬ－エピ－２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物が細菌である、請求の範囲９に記載の方法。

１１．請求の範囲９に記載のミオ－イノシトールをＬ－エピ－２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物がグラム陰性細菌である、請求の範囲９に記載の方法。

１２．請求の範囲９に記載のミオ－イノシトールをＬ－エピ－２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物が、グラム陰性細菌であり、シュードモナダセア（Pseudomonadaceae）科に属するキサントモナス（Xanthomonas）属またはシュードモナス（Pseudomonas）属の細菌、あるいはアセトバクテラセア（Acetobacteraceae）科に属するアセトバクター（Acetobacter）属またはグルコノバクター（Gluconobacter）属の細菌、あるいはリゾビアセア（Rhizobiaceae）科に属するアグロバクテリウム（Agrobacterium）属の細菌、あるいはエンテロバクテリアセア（Enterobacteriacea）科に属するエルウィニア（Erwinia）属、エンテロバクター（Enterobacter）属、セラチア（Serratia）属またはエルシニア（Yersinia）

属の細菌、あるいはパステウレアセア（Pasteurellaceae）科に属するパステウレラ（Pasteurella）属またはヘモフィルス（Haemophilus）属の細菌から選ばれるグラム陰性細菌である請求の範囲９に記載の方法。

１３．請求の範囲９に記載のミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物が、キサントモナス（Xanthomonas）・エスピーＡＢ１０１１９株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７１６８として寄託）あるいはシュードモナス（Pseudomonas）・エスピーＡＢ１０２１５株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７１７０として寄託）あるいはエルウィニア（Erwinia）・エスピーＡＢ１０１３５株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７１６９として寄託）である請求の範囲９に記載の方法。

１４．請求の範囲９に記載のミオーイノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物を、ミオーイノシトール並びに炭素源及び窒素源を含有する液体培地よりなる水性媒質中で好気的に培養しながら、該微生物をミオーイノシトールに作用させて、得られた培養液中にＬ－エピー２－イノソースを生成し且つ蓄積させて微生物菌体とＬ－エピー２－イノソースとを含有する反応液として、培養液を収得する工程と、その培養液から該微生物の菌体を除去して、Ｌ－エピー２－イノソースを含有する反応液ろ液として、得られた培養上清液を収得する工程と、該培養上清液に直接にＬ－エ

ピー２－イノソースの還元のための還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加し、該還元剤でＬ－エピー２－イノソースを還元する反応を行い、これによりエピ－イノシトール及びミオ－イノシトールを該反応液ろ液、すなわち該培養上清液内で生成する工程と、こうして得られたところの還元反応の反応液、すなわち生成されたエピ－イノシトールとミオ－イノシトールを含有する培養上清液から、エピ－イノシトールとミオ－イノシトールを回収する工程と、回収されたエピ－イノシトールとミオ－イノシトールを相互から分離する工程とからなる請求の範囲９に記載の方法。

１５．請求の範囲９に記載のミオ－イノシトールをＬ－エピー２－イノソースへ変換できる能力を有する微生物を、炭素源及び窒素源を含有する液体培地で好気的に培養して該微生物の培養液を収得し、さらに該培養液から該微生物の菌体を分離する工程と、こうして得られた微生物菌体を緩衝液または液体培地よりなる水性媒質中でミオ－イノシトールと反応させて、Ｌ－エピー２－イノソースを生成させる工程と、こうして得られたところの、該微生物菌体と生成されたＬ－エピー２－イノソースとを含有する反応液から菌体を除去して、これにより、微生物菌体を除去されたがＬ－エピー２－イノソースを含有する得られた反応液ろ液を収得する工程と、このＬ－

エピー２－イノソース含有の反応液ろ液に還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加し、該還元剤をＬ－エピー２－イノソースに作用させて還元する反応を行い、これによりエピーイノシトール及びミオーイノシトールを該反応液ろ液内で生成する工程と、こうして得られて、生成されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを含有する還元反応の反応液から、エピーイノシトールとミオーイノシトールを回収する工程と、回収されたエピーイノシトールとミオーイノシトールを相互から分離する工程とからなる請求の範囲９に記載の方法。

１６．請求の範囲１４または１５に記載の方法における還元剤を添加してＬ－エピー２－イノソースを還元剤で還元する工程を行う前に、Ｌ－エピー２－イノソースを含有する培養上清液または反応液ろ液よりなる水性媒質のpHを、pH８～１２の範囲のアルカリ性に予め調整する工程を行い、その後、Ｌ－エピー２－イノソースを含有するpH８～１２の該水性媒質に、還元剤として水素化ホウ素アルカリ金属、水素化トリアルコキシホウ素アルカリ金属またはシアン化ホウ素アルカリ金属を添加して該還元剤をＬ－エピー２－イノソースに作用させて還元する反応を行い、これにより、副成されたミオーイノシトールの生成量よりもはるかに高い生成量でエピーイノシ

トールを生成させることを特徴とする、請求の範囲１４または１５に記載の方法。

１７．Ｌ－エピ－２－イノソースを還元するのに用いられる還元剤は、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化メトキシホウ素ナトリウムまたはシアン化水素化ホウ素ナトリウムである請求の範囲９に記載の方法。

１８．用いる水性媒質は水であり、用いる還元剤が水素化ホウ素ナトリウムである請求の範囲９に記載の方法。

１９．ミオ－イノシトールをＬ－エピ－２－イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所にＦＥＲＭ　ＢＰ－７１６８の受託番号で寄託されたキサントモナス・エスピーＡＢ１０１１９株。

２０．ミオ－イノシトールをＬ－エピ－２－イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所にＦＥＲＭ　ＢＰ－７１７０の受託番号で寄託されたシュードモナス・エスピーＡＢ１０２１５株。

２１．ミオ－イノシトールをＬ－エピ－２－イノソースへ変換できる特性を有して工業技術院生命工学工業技術研究所にＦＥＲＭ　ＢＰ－７１６９の受託番号で寄託されたエルウィニア・エスピーＡＢ１０１３５株。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/03687

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P19/02, C12N1/20 //(C12P19/02, C12R1:64), (C12P19/02, C12R1:38), (C12P19/02, C12R1:02), (C12P19/02, C12R1:18), (C12P19/02C12R1:425) (C12P19/02, C12R1:21), (C12P19/02, C12R1:01), (C12N1/20, C12R1:64), (C12N1/20, C12R1:38), (C12N1/20, C12R1:18)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P19/02, C12N1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY/CA(STN),
WPI/BIOSIS(DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, 5406005, A (PICCARIELLO T.), 11 April, 1995 (11.04.95) (Family: none)	1-21
A	DE, 3405663, A (MERCK PATENT GMBH), 22 August, 1985 (22.08.85) & JP, 60-248637, A	1-21
A	EP, 477001, A (ASAHI KASEI KOGYO KK, TOYO JOZO KK), 25 March, 1992 (25.03.92) & JP, 04-126075, A & US, 5356790, A	1-21
A	Paul P Hipps et al., "Identification and Partial Characterization of Inositol:NAD$^+$ Epimerase and Inosose :NAD(P)H Reductase from the Fat Body of the American Cockroach, Periplaneta americana L.", BIOCHEMISTRY, (1973), Vol.12, No.23, pp.4705-4712	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 04 September, 2000 (04.09.00)	Date of mailing of the international search report 12 September, 2000 (12.09.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT／JP00／03687

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int.Cl⁷ C12P19/02、C12N1/20 //(C12P19/02,C12R1:64)、(C12P19/02,C12R1:38)、(C12P19/02,C12R1:02)、(C12P19/02,C12R1:18)、(C12P19/02,C12R1:425)(C12P19/02,C12R1:21)、(C12P19/02,C12R1:01)、(C12N1/20、C12R1:64)、(C12N1/20、C12R1:38)、(C12N1/20、C12R1:18)

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））
Int.Cl⁷ C12P19/02、C12N1/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
REGISTRY/CA(STN)、
WPI/BIOSIS(DIALOG)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	US,5406005,A (PICCARIELLO T.) 11.4月.1995 (11.04.95) (ファミリーなし)	1-21
A	DE,3405663,A (MERCK PATENT GMBH) 22.8月.1985 (22.08.85) & JP,60-248637,A	1-21
A	EP,477001,A(ASAHI KASEI KOGYO KK、TOYO JOZO KK) 25.3月.1992 (25.03.92) & JP,04-126075,A & US,5356790,A	1-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日　04.09.00	国際調査報告の発送日　12.09.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100−8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員）　4N　9641 甲斐　順子　印 電話番号　03−3581−1101　内線　3488

C（続き）．関連すると認められる文献		
引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	Paul P Hipps et al., "Identification and Partial Characterization of Inositol:NAD^+ Epimerase and Inosose:NAD(P)H Reductase from the Fat Body of the American Cockroach, *Periplaneta americana* L.", BIOCHEMISTRY, (1973), Vol. 12, No. 23, p. 4705-4712	1-21